

ОБЗОРЫ

А.И. Жебентяев, Е.Н. Каткова

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

Рассмотрено современное состояние иммуноферментного анализа лекарственных веществ. Описаны основные способы получения и очистки специфических антител, иммуногенов, ферментных конъюгатов. Приведены примеры определения лекарственных веществ иммуноферментным методом, перечислены возможные причины ошибок в определении лекарственных веществ методами иммуноферментного анализа.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, лекарственные вещества.

ВВЕДЕНИЕ

Инструментальные методы анализа (хроматографические, электрохимические, спектрометрические), применяемые для обнаружения и количественного определения лекарственных веществ в биологических жидкостях, как правило, требуют предварительной пробоподготовки образцов [1,2].

Использование специфических взаимодействий антиген-антитело позволяет проводить идентификацию и количественное определение большого круга целевых аналитов. Поскольку реакция проводится непосредственно в биожидкости, то не требуется дополнительного применения методов изолирования и очистки. Методы иммунохимического анализа позволяют одновременно анализировать большое число проб, что является удобным для целей экспресс-анализа.

Для определения лекарственных веществ и их метаболитов широко используется метод иммуноферментного анализа (ИФА). В настоящей статье рассмотрены история развития, возможности применения иммуноферментного анализа.

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

В 1959 г. Р.С. Ялоу и С.А. Берсон предложили иммунологический метод количественного определения инсулина в плазме крови человека. Метод основан на конкуренции между немеченым инсулином и инсулином, меченым ^{131}I , за число мест

связывания на антителах к инсулину. Количество инсулина в плазме обратно пропорционально количеству меченого инсулина, связавшегося с антителами. Легкость измерения низких уровней радиоактивности, высокая специфичность связывания определяемого вещества антителами были положены в основу нового метода, названного иммунологическим.

Наряду с преимуществами (универсальность, избирательность и специфичность, чувствительность и простота проведения), радиоиммунологический анализ (РИА) обладает и недостатками. К основным недостаткам относятся: короткий период полураспада изотопов, опасность для здоровья при работе с изотопными метками, излучение повреждает структуру меченых молекул, трудность автоматизации РИА и др. [3,4].

В 1971 году Е. Энгвалл, Р. Пелманн, В.К. ван Вемен и А.Н. Шуурс предложили другой тип чувствительных и универсальных меток для иммуноанализа – ферменты.

Ферментные метки наиболее чувствительны и универсальны, так как являются белковыми молекулами с мощным каталитическим действием. Большинство ферментных меток способны за 1 мин превращать в продукты 10 молекул субстрата в расчете на 1 молекулу фермента. Каталитическая активность фермента значительно зависит от его трехмерной структуры (конфигурации). Другое преимущество ферментных меток обусловлено наличием в их молекулах многочисленных функци-

ональных групп (аминогрупп, карбоксильных, сульфгидрильных, остатков тирозина), через которые можно присоединять молекулы лигандов [5].

Активность метки в фракции измеряют после отделения меченых и немеченых антигенов, связавшихся с антителами, от свободных антигенов. Такой метод относят к иммуноанализу с разделением компонентов и называют гетерогенным твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Разработанный К.Е. Рубенштейном и др. в 1972 г. метод иммуноферментного анализа не требует разделения связанных с антителами и свободных антигенов. В этом методе измеряют удельную активность фермента при связывании антител с мечеными антигенами. Этот метод называют гомогенным иммуноанализом, так как при таком анализе гетерогенные фазы для разделения связанных и свободных антигенов не требуются. Более подходящим термином

для такого метода является «иммуноанализ без разделения компонентов» [4,5].

Иммуноферментный анализ без разделения компонентов с использованием в качестве ферментной метки лизоцима был предложен для определения морфина. Метод получил название гомогенный ИФА, так как в этом методе нет необходимости разделять формы меченного ферментом антигена (свободная форма антигена и связанная с антителами) [4].

Принцип анализа показан на рисунке 1.

Антиген (морфин) в образце конкурирует с антигеном, связанным с ферментом, за образование комплекса с антителами. Образующийся комплекс Ат-Аг-Ф обладает низкой ферментативной активностью. При наличии антигена в пробе образуется комплекс Ат-Аг, часть Аг-Ф остается в несвязанном состоянии и катализирует превращение субстратов в продукты. В этом варианте ИФА ферментативная активность прямо пропорциональна количеству свободного антигена в пробе.

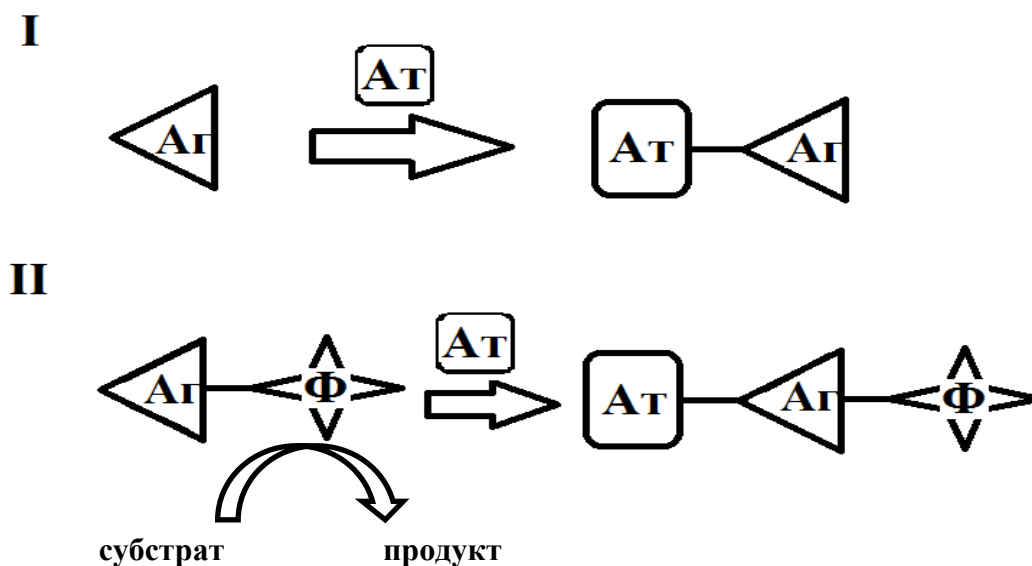


Рисунок 1 – Принцип иммуноферментного анализа без разделения компонентов с использованием в качестве метки антигена (Аг), меченного ферментом (Ф)

Иммуноферментный анализ с разделением компонентов (гетерогенный анализ) отличается тем, что меченный ферментом антиген (Аг-Ф) конкурирует с антигеном анализируемого образца за ограниченное число антител, находящихся (иммобилизованных) на твердом носителе. После инкубирования (определенная температура

и продолжительность) отделяют комплекс Аг-Ф-Ат от свободного Аг-Ф и анализируют фракцию, связанную с антителами. Чем больше антигена содержится в пробе, тем меньше ферментативная активность твердой фазы.

ИФА с разделением компонентов обладает высокой чувствительностью. На-

пример, ИФА с разделением компонентов позволяет определять ферритин с чувствительностью до $2 \cdot 10^{-19}$ М [5].

Выделяют два типа иммуноферментных гетерогенных методов – конкурентный и неконкурентный (последовательный) анализ.

Последовательный гетерогенный анализ состоит из двух стадий. На первой стадии антитела, адсорбированные на

твердом носителе, взаимодействуют с антигеном или каким-либо другим анализируемым белком. Отмывают несвязавшиеся компоненты и прибавляют раствор, содержащий антитела, конъюгированные с ферментом. Затем отмывают (вторая стадия) несвязавшиеся компоненты и в систему вводят соответствующий субстрат для осуществления ферментативной реакции (рисунок 2).

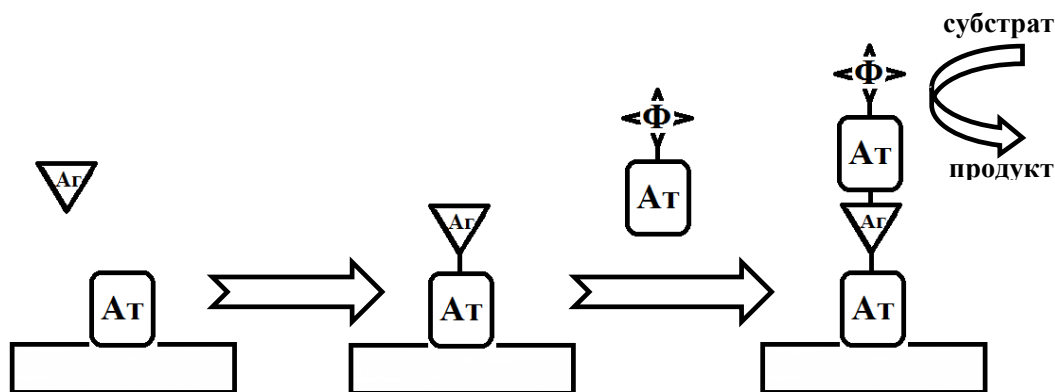


Рисунок 2 – Неконкурентный вариант иммуноферментного гетерогенного метода анализа

В конкурентном гетерогенном анализе связанные и несвязанные с ферментативной меткой антигены вступают в конкурентное взаимодействие с антителами, иммобилизованными на твердом носителе (рисунок 3).

После инкубации отмывают избыток несвязавшихся компонентов и в систему вводят соответствующий субстрат.

При проведении иммуноферментного анализа необходима учитывать влияние ряда факторов: природа и способ подготовки носителя, тип и содержание конъюгированного фермента, последователь-

ность реакций, время инкубации, возможность проявления «матричных эффектов» [1-5].

К настоящему времени разработаны многие технологии ИФА, которые объединяют использование ферментов в качестве меток и возможность их детектирования с помощью соответствующих ферментных систем. Современные работы, посвященные ИФА, рассматривают различные аспекты структуры иммуногенов (дизайн гаптена, выбор белка-носителя), тип получаемых антител (поликлональные, моноклональные) и формат ИФА.

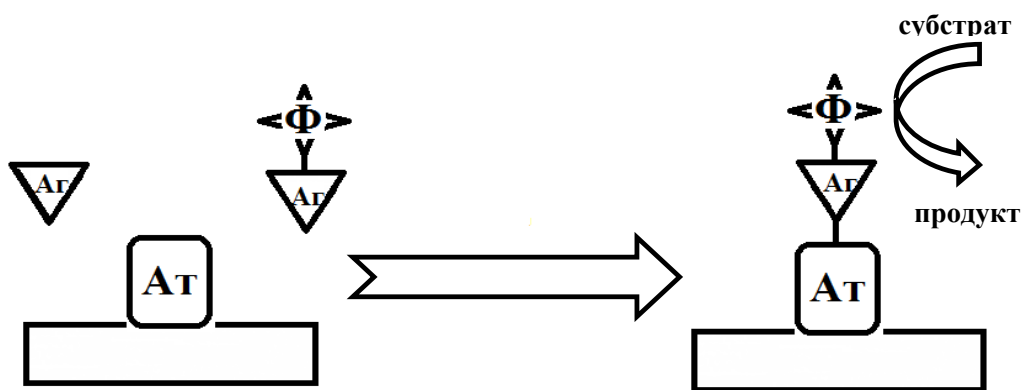


Рисунок 3 – Конкурентный вариант иммуноферментного гетерогенного метода анализа

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА АНТИТЕЛ

Один из главных этапов разработки любой методики иммуноанализа – получение специфических антител к определяемому антигену. В значительной мере именно от качества антител зависит чувствительность и специфичность методики анализа. В иммунологических исследованиях часто возникает необходимость в получении очищенных препаратов антител, т.е. антигенспецифичных либо неспецифичных иммуноглобулинов [6,7].

Антитела получают путем иммунизации животных (мыши, морские свинки, кролики) соответствующим антигеном.

Выделение неспецифичных иммуноглобулинов из сыворотки обычно проводят путем последовательного фракционирования белков, которое включает следующие этапы: осаждение гамма-глобулинов в 30-50% растворе сульфата аммония, гель-фильтрация для получения молекул соответствующего размера, ионообменная хроматография с целью выделения молекул, несущих суммарный положительный заряд при нейтральном pH, аффинная хроматография с использованием естественных лигандов иммуноглобулинов [8-10].

Выделение антигенспецифичных иммуноглобулинов осуществляют методом аффинной хроматографии. Антиген «пришивают» к частицам сефарозы и связавшиеся с ним «чистые» антитела элюируют с иммуносорбента буферным раствором (глицин-HCl) или раствором тиоцианата натрия. Метод аффинной хроматографии применяют и для получения очищенных препаратов антигенов. Один цикл аффинной хроматографии позволяет очистить белки в 1000 раз и более [8-11].

Однако даже такой способ очистки не позволяет полностью избавиться от гетерогенности препарата антител. Выход из этого затруднения – получение антител с одной специфичностью, реагирующих с единственной антигенной детерминантой. Такие антитела называются моноклональными. Их получают методами клеточной инженерии путем гибридизации иммунокомпетентных В-лимфоцитов и клеток миеломных опухолей, способных к быстрому размножению, неограниченному числом делений (в отличие от большинства неопухолевых клеток, у которых число делений ограничено). Препараты моноклональных антител характеризуются постоянством

состава и физико-химических свойств, низкой вероятностью перекрестной реакции с "чужими" антигенами. Это высокотехнологичный продукт. Его недостаток – часто сравнительно низкое сродство к субстрату, низкая аффинность [7,12].

СИНТЕЗ ИММУНОГЕНОВ

Иммунный ответ возникает в организме только при введении соединения, молекулярная масса которого превышает 3000. Поэтому получение антител к низкомолекулярным антигенам осложнено тем, что они сами по себе не индуцируют образование антител. Чтобы перевести небольшие молекулы в иммуногенное состояние, можно агрегировать их в частицы большего размера или присоединить к белку-носителю (т.е. синтезировать иммуноген) [7,8].

Белком-носителем чаще всего служит человеческий или бычий альбумин. На рис. 4 приведен пример синтеза иммуногена посредством реакций по аминным группам. Сначала аминокислоты гаптена и белка связывают с карбонильными группами глутарового альдегида с образованием двойного шиффова основания. Затем продукт реакции восстанавливают [3].

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ КОНЬЮГАТОВ

Наиболее часто в ИФА используют ферменты: пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, ацетилхолинэстераза, каталаза, уреазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа и др. (таблица 1).

Ферменты, используемые в ИФА, должны соответствовать ряду общих требований:

- высокая специфичность и удельная каталитическая активность фермента, позволяющая обнаруживать ферментативную метку в низких концентрациях;
- доступность ферментов, возможность получения достаточно чистых ферментных препаратов, стабильность при хранении и после модификации;
- фермент не должен содержаться в анализируемой биожидкости;
- простота и чувствительность метода определения продуктов ферментативной реакции [1, 2, 5].

Активность ферментов детектируют по изменению оптической плотности, флу-

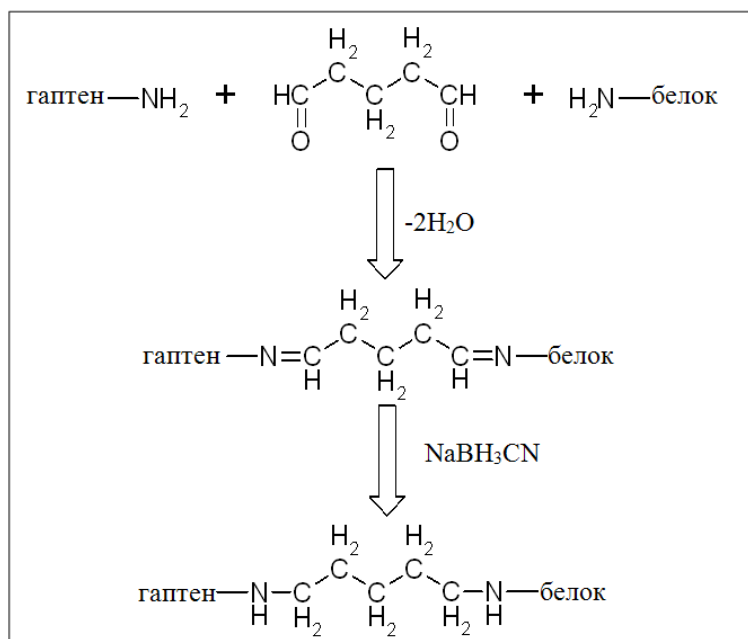


Рисунок 4 – Схема синтеза иммуногена по реакции глутарового альдегида с аминогруппами гаптена и белка [3]

ориметрическим и электрохимическим методами [13-26].

Разработка методов ИФА связана с необходимостью получения конъюгатов ферментов-маркеров с антигенами или антителами, в которых антиген или антитело сохраняет иммунологическую активность и не происходит инактивация фермента. Однако все основные подходы, используемые для химического конъюгирования белков и гаптен, приводят к частичной инактивации ферментов и гетерогенности конъюгатов, что влияет на специфичность и чувствительность иммуноферментного анализа. Методами генной инженерии можно получать рекомбинантные конъю-

гаты белков с антителами. Такие конъюгаты имеют ряд преимуществ – они гомогенны по составу, имеют стехиометрию 1:1, сохраняют функциональную активность как белка-маркера, так и антигена/антитела, а также воспроизводимость и относительную простоту получения [7-11].

ВАРИАНТЫ ИФА И ПРИМЕРЫ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

Выбор технологии ИФА зависит от конкретной прикладной задачи, на решение которой будет направлен анализ. Часто в химико-токсикологическом исследовании достаточно установить лишь факт наличия или отсутствия веществ в образцах.

Таблица 1 – Ферменты, используемые в ИФА [5]

Фермент	Индикаторная система	Метод регистрации активности фермента
пероксидаза хрена	H ₂ O ₂ /хромоген (о-фенилендиамин, 5-аминосалициловая кислота)	фотометрический, флуориметрический, хемилюминесцентный, электрохимический
щелочная фосфатаза	4-нитрофенилфосфат	фотометрический, флуориметрический
β-галактозидаза	2-нитро-β-D-галактозид	фотометрический
ацетилхолинэстераза	ацетилхолин/5,5'-дителиобис(2-нитробензойная кислота)	фотометрический
глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	NADP ⁺ /NADPH	фотометрический, флуориметрический
глюкозооксидаза	H ₂ O ₂ /хромоген	фотометрический

Иногда, однако, важно определить концентрацию веществ в образцах с высокой точностью.

Перспективными вариантами ИФА, используемыми на практике, являются технологии ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – гетерогенный твердофазный иммуноферментный анализ), EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Tests – ферментно-мультиплицируемый иммунный тест), CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immunoassay – клонированный ферментно-донорный иммуноанализ), KIMS (Kinetic Interaction of Microparticles in Solution – кинетическое взаимодействие микрочастиц в растворе) [9-11, 14,16,17].

В литературе встречаются многочисленные сведения об использовании ИФА для диагностики и определения наркотических и лекарственных веществ в различных биологических жидкостях. Определены минимальные определяемые концентрации для сульфаниламидных препаратов (сульфамеразин, сульфатиазол, сульфаметазин, сульфадиазин) [8], лизиноприла [18], эналаприла [18], клофелина [19], производных барбитуровой кислоты [20], производных бензодиазепинов [21-23], морфина [24], амфетаминов [25], каннабиноидов [11, 26]. Имеются сведения об использовании ИФА для анализа посмертной крови на присутствие кокаина и опиатов [15].

В настоящее время выпускаются готовые коммерческие наборы реагентов, позволяющие выявлять лекарственные вещества с гарантированным пределом обнаружения 300 – 500 нг/мл фирм Syva (США), F. Hoffmann-La Roche Ltd (Франция), ИФАВ РАН (СНГ), Abbot (США). Коммерческие диагностические наборы преимущественно основаны на принципах твердофазного ИФА. В большинстве производимых наборов используются поликлональные антитела, поскольку их получение сопряжено с меньшими затратами средств. Реализованы наборы чаще всего на микропланшетах или в пробирках [1,2].

ВОЗМОЖНЫЕ ИСТОЧНИКИ ОШИБОК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Ошибки, возникающие при определении лекарственных веществ методами ИФА, могут быть обусловлены рядом причин.

Используемые для анализа биологические жидкости могут оказывать влияние на активность фермента-метки за счет солевого состава, изменяющего значение pH и ионную силу анализируемого образца.

На результат анализа могут повлиять примесь эндогенного фермента или солевые формы метаболитов, теряющие способность конкурировать в иммунологической реакции за счет связывания с белками биожидкости [27, 28].

Следует избегать возможного попадания в реакционную смесь химических ингибиторов белков. Многие соли тяжелых металлов, например, ртутьсодержащие консерванты, являются ингибиторами ферментов. Антикоагулянты, ЭДТА, некоторые метаболиты лекарственных веществ также снижают активность ферментов [27].

Так, например, тесты ИФА могут давать ложноотрицательные результаты, если в пробе присутствуют консерванты (азид натрия, бензоат натрия, которые добавляют для сохранности проб), так как используемые консерванты блокируют активность фермента пероксидазы хрена [1].

Особая специфическая проблема определения лекарственных веществ иммунохимическими методами анализа – перекрестная реактивность или кросс-реакция (связывание структурно-родственных веществ) [1,2]. Перекрестная реактивность для определяемых веществ должна быть подтверждена. Большинство производителей исследуют потенциальные мешающие вещества и их перечень прилагается к иммунонаборам.

Кровь умершего со временем разлагается, продуцируя биогенные амины, которые перекрестно реагируют с антителами в иммунологических исследованиях, что также приводит к ложноположительным результатам [15].

Для избежания получения ложноположительных результатов требуется, чтобы все образцы, положительные в иммунохимических тестах, подтверждались другими методами (тонкослойная хроматография, газовая хроматография, высокоэффективная газовая хроматография, хромато-масс-спектрометрия) [1,2,4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ряд достоинств иммуноферментного

анализа (высокая чувствительность, специфичность, малые объемы проб, скорость выполнения анализа) позволяют использовать его в качестве предварительного метода для скрининг-диагностики лекарственных и наркотических веществ в биологических средах.

SUMMARY

A.I. Zhebentyaev, E.N. Katkova
ENZYME IMMUNOASSAY METHOD OF ANALYSIS

The current state of enzyme immunoassay analysis of drugs was considered. The basic methods of preparation and purification of specific antibodies, immunogens, enzyme conjugates were described. Examples of certain drug substances determined by enzyme immunoassay method were given, possible sources of error in the determination of drugs by enzyme immunoassay were listed.

Keywords: enzyme immunoassay analysis, drug substances.

ЛИТЕРАТУРА

1. Токсикологическая химия: метаболизм и анализ токсикантов / Под ред. проф. Н.И. Калетиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 1008 с.
2. Токсикологическая химия / Под ред. проф. Т.В. Плетеневой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 512 с.
3. Отто, М. Современные методы аналитической химии. 3-е издание / М. Отто. – Москва: Техносфера, 2008. – 544 с.
4. Иммуноферментный анализ: Пер. с англ. / Под ред. Т. Нго, Г. Ленхоффа. – М.: Мир, 1988. – 446 с.
5. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.]. – М.: Высш. школа, 1991. – 288 с.
6. Ярилин, А.А. Иммунология / А.А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
7. Ройт, А. Иммунология. Пер. с англ. / А.Ройт, Дж. Бростофф, Д.Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
8. Иммунохимические методы определения сульфаниламидных препаратов / И.С. Нестеренко и [др.] // Журнал аналитической химии. – 2009. – Т. 64, № 5. – С. 453-462.
9. Twyman, R.M. Immunoassays, applications: Clinical. In: Worsfold P., Townshend A, Poole C. Encyclopedia of Analytical Science (2nd edn). – Elsevier Science, London, 2005. – Vol. 4. – P. 317-324.
10. Twyman, R.M. Immunoassays: Overview. In: Worsfold P., Townshend A, Poole C. Encyclopedia of Analytical Science (2nd edn). – Elsevier Science, London, 2005. – Vol. 4. – P. 299-306.
11. Гендриксон, О.Д. Молекулярно импринтированные полимеры и их применение в биохимическом анализе / О.Д. Гендриксон, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 149-192.
12. Гальвидис, И.А. Иммуноферментный анализ на основе моноклональных антител для определения аминогликозидного антибиотика канамицина в продуктах питания / И.А. Гальвидис, М.А. Буркин // Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36, № 6. – С. 789-796.
13. Immunochemistry in 2008 / Jean-Pierre Goullé [et all] // Annales toxicology Analytique. – 2009. – Vol. 21, №1. – P. 49-53.
14. Labat, L. Immunoanalysis and toxicology / L. Labat, M. Deveaux // Annales toxicology Analytique. – 2009. – Vol. 21, № 1. – P. 1-2.
15. Applicability of an immunoassay test for its use in post-mortem blood regarding to cocaine and opiates / Arroyo A. [et all] // Annales toxicology Analytique. – 2010. – Vol. 22, № 4. – P. 201-206.
16. Анализ наркотических веществ в физиологических жидкостях человека методом латексной агглютинации / Солодухина Н.А. [и др.] // Вестник МИТХТ. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 93-96.
17. Новый метод иммуноанализа антител человека к химическим канцерогенам / А.Н. Глушков [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 3. – С. 42-44.
18. Буркин, А. А. Иммуноферментный анализ лекарственных веществ и их метаболитов. Сообщение 2. Лизиноприл и эналаприлат / А. А. Буркин, М. А. Буркин // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, № 6. – С. 54-56.
19. Буркин, А. А. Иммуноферментный анализ клофелина / А. А. Буркин, М. А. Буркин // Судебно-медицинская экспертиза: научно-практический журнал. – 2007. – Т. 50, № 4. – С. 30-32.
20. Острые отравления барбитуратами и их лабораторная диагностика / С.Н. Бо-

рисевич и [др.] // Здравоохранение. – 2011. – № 4. – С. 52-55.

21. Буркин, А.А. Иммуноферментный анализ лекарственных веществ и их метаболитов. Сообщение 3. 1,4-бензодиазепины / А.А. Буркин, А.В. Смирнов // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, № 10. – С. 48-52.

22. Обнаружение производных 1,4-бензодиазепина в тканях печени иммунохимическими методами / С.Б. Лисовская [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2001. – Т. 44, № 1. – С. 20-25.

23. Твердофазный иммуноферментный метод количественного определения гидазепама в моче человека / Ж.Н. Трубачева [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. – № 10. – С. 49-51.

24. Латексные микросферы для определения морфина в физиологических жидкостях человека / Солодухина Н.М. [и др.] // Вестник МИТХТ. – 2010. – Т. 5. № 2. – С. 55-59.

25. Твердофазный иммуноферментный метод определения амфетаминов в моче / Ш. А. Демерчян [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика: научно-практический журнал. – 2007. – № 12. – С. 20-22.

26. Quantitation of tetrahydrocannabinol in hair using immunoassay and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection / Coulter C. [et al] // Drug Testing et Analysis. – 2009. – Vol. 1, № 5. – P. 234-239.

27. Ошибки при проведении иммуноферментного анализа / В.Е. Шаркова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 3. – С. 42-45.

28. Пивень, Н.В. Иммунохимический анализ: научные основы, тенденции развития и возможности практического использования / Н.В. Пивень // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2007. – № 2. – С. 6-22.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет»,
кафедра токсикологической
и аналитической химии,
тел. раб. 8(0212) 37-00-06,
Жебентяев А.И.

Поступила 25.03.2013 г.